

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP2004/006360

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

30. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2003年 5月14日

出願番号  
Application Number:

特願2003-136477

[ST. 10/C]: [JP2003-136477]

REC'D 01 JUL 2004

WIPO

PCT

出願人  
Applicant(s):

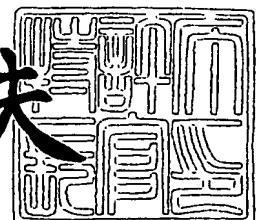
独立行政法人 科学技術振興機構

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3050360

【書類名】 特許願  
【整理番号】 B05P02  
【提出日】 平成15年 5月14日  
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
C12N 15/11  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区本駒込1丁目14番1号  
【氏名】 後藤 順  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都足立区綾瀬2丁目18番3-102号  
【氏名】 劉 万兆  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都大田区田園調布1丁目47番17号  
【氏名】 金澤 一郎  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都板橋区中丸町44番地7号ライオンズマンション  
板橋中丸町605号  
【氏名】 村田 美穂  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都小平市小川東町4丁目1番1号 I-301  
【氏名】 和田 圭司  
【特許出願人】  
【識別番号】 396020800  
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
【代表者】 沖村 憲樹

**【代理人】**

【識別番号】 100107984

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

**【手数料の表示】**

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

**【提出物件の目録】**

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハンチントン病遺伝子の発現抑制

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的な二重鎖RNAを用いることを特徴とするハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 2】 ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的な二重鎖RNAが、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的な短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項1記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 3】 ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列が、ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域であることを特徴とする請求項1又は2記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 4】 ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に相同的な二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び配列表の配列番号4に示される塩基配列からなる二重鎖RNA配列を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 5】 ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に相同的な短二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び該塩基配列に相補的な配列である配列表の配列番号4に示される塩基配列からなる短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項2又は3記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 6】 ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的な短二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示されるRNA配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された塩基配列と該塩基配列に相補的な塩基配列との短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項2又は3記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項 7】 二重鎖RNAが、合成により製造されたそれぞれのRNAから形成された二重鎖RNAであることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項8】 二重鎖RNAが、それぞれのRNAを遺伝子組換え方法を用いることにより製造された二重鎖RNAであることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項9】 遺伝子組換え方法を用いることにより製造された二重鎖RNAが、請求項1～6のいずれか記載のRNAをそれぞれ転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞に導入し、生成されたRNAを取得することによって形成されたものであることを特徴とする請求項8記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを有効成分とするハンチントン病遺伝子の発現抑制剤。

【請求項11】 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを有効成分とするハンチントン病予防及び／又は治療薬。

【請求項12】 薬学的に許容される担体とともに、二重鎖RNAを含有することを特徴とする請求項11記載のハンチントン病予防及び／又は治療薬。

【請求項13】 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを、哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することを特徴とするハンチントン病の発症の予防及び／又は治療方法。

【請求項14】 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入し、発現することを特徴とする哺乳動物の生体或いは生体細胞におけるハンチントン病遺伝子の発現を抑制する方法。

【請求項15】 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子の哺乳動物生体或いは生体細胞への導入を、請求項1～6のいずれか記載のRNAをそれぞれ転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することによって行われることを特徴とする請求項14記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ハンチントン病遺伝子の発現抑制方法、特に、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的な二重鎖RNAを用いたハンチントン病遺伝子の発現抑制方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

ハンチントン病（HD）は、運動障害、認識喪失及び精神医学症状発現を特徴とする進行性の神経変性障害である（J. Med. 315, 1267-1276, 1986）。この病気は、普通、年齢30～50歳の中年で発症するが、ある場合には非常に早期に、又は前記年齢よりも遅い時期に発症する場合もある。病徵は進行性であり、殆んどの場合は、運動障害の続発性の合併症の結果として発症の10～20年後に死を招來する。ハンチントン病個体の脳の死後調査により、線条体に影響するニューロンの選択的喪失が判明している。ハンチントン病（HD）遺伝子は、ヒトでは染色体4の短腕における末端の細胞遺伝子学的サブバンド内にあるloci D4S126及びD4S98に挟まれた2.2Mb領域にマッピングされている（Neuron 3, 183-190, 1989、J. Hum. Genet. 49, 7-16, 1991、Am. J. Hum. Genet. 51, 357-362, 1992）。

#### 【0003】

ハンチントン病は、HD遺伝子転写の第1エクソンにおいてCAGリピートが伸長し、ポリグルタミン（poly Q）トラクトに翻訳され、その結果脳線条体神経細胞が進行的に喪失することによる遺伝性の神経変性疾患である（Annu. Rev. Med. 47, 201-209, 1996）。すなわち、ハンチントン病は、HD遺伝子の第1エクソン部位上の非定常的なCAGリピートの伸長によって引き起こされ、選択的脳線条体神経の死（loss）に至る。HD遺伝子は、ハンチントンという分子量348kDaの細胞質タンパク質をコードし、中枢神経系（CNS）及び非中枢神経系（non-CNS）組織の両方において広く発現している。ハンチントンタンパク質において、HD遺伝子のCAG3連配列（CAG triplets）はポリグルタミン（poly Q）に翻訳される。一般的に、正常及び変異HDアレル中に、それぞれ6～37、35～180のCAGリピートが含まれる。

#### 【0004】

昨今、ハンチントン病に対する処置方法として、ハンチントン病のH D 遺伝子を処置したり、H D 遺伝子をターゲッティングにした方法、或いは、ハンチントン病のH D 遺伝子の発現するタンパク質に拮抗する物質を用いた方法等が開示されている。例えば、特開平7-67661号公報には、患者の細胞に正常なハンチントンタンパク質を発現するようなDNAを導入して、病気のH D 遺伝子を正常な遺伝子で置換する方法や、患者の細胞にハンチントン病のH D 遺伝子のアンチセンスRNAを転写・発現可能な配列をコードする遺伝子を導入する方法、或いはハンチントン病のハンチントンタンパク質にアンタゴニストを投与する方法等の処置方法が開示されている。また、特表2003-503008号公報には、ハンチントン病のような常染色体優性疾患に対する処置方法として、ハンチントン病のRNAを標的とした対立遺伝子特異的ターゲッティングによる処置方法が開示されている。しかし、これらの処置方法は、遺伝子導入の複雑さや安定性の問題、或いは得られる処置効果の面から、必ずしも期待通りのものとはなっていない。

#### 【0005】

一方、近年、ある種の生物（線虫：*Caenorhabditis elegans*）では、二本鎖RNAによって遺伝子の発現を特異的に阻害できることが見い出された（Nature 391, 806-811, 1998、WO 99/32619）。この現象は、ある遺伝子と相同な、センスRNAとアンチセンスRNAからなる二本鎖RNA（double-strand RNA：ds RNA）が、その遺伝子の転写産物（mRNA）の相同部分を破壊するという現象で、RNAi（RNA interference）と呼ばれている。この現象は、その後、種々の動物（Cell 95, 1017-1026, 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692, 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5049-5054, 1999）や、植物（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964, 1998）を含む下等な真核細胞において見い出されている。

#### 【0006】

RNAiは、発見された当初、哺乳動物細胞においては、約30bp以上のds RNAを細胞内へ導入すると、細胞が本来持っている免疫機能によりアポトーシスを起こし、細胞が死んでしまうため、哺乳動物細胞での利用は困難と思われ

ていた。しかし、2000年にマウス初期胚や哺乳動物培養細胞でも、RNAiが起こりうることが示され、RNAiの誘導機構そのものは、哺乳動物細胞にも存在することが明らかになってきた (FEBS Lett 479, 79-82, 2000, WO 01/36646)。

#### 【0007】

このようなRNAiの機能を利用して、哺乳動物において、ある特定の遺伝子又は遺伝子群の発現を阻害することができれば有益であることは明らかである。多くの疾病（癌、内分泌疾患、免疫疾患など）は、哺乳動物の中で、ある特定の遺伝子又は遺伝子群が異常発現することによって起こるので、遺伝子又は遺伝子群の阻害は、これらの症状を治療するために使用することができる。また、変異型タンパク質の発現に起因して疾病が発症することもあり、このような場合には、変異した対立遺伝子の発現を抑えることで、疾病的治療が可能となる。更に、このような遺伝子特異的な阻害は、例えば、HIVなどのレトロウイルス（レトロウイルス中のウイルス遺伝子は、それらの宿主のゲノム中に組み込まれて、発現される）によって引き起こされるウイルス疾患を治療するためにも使用し得る。

#### 【0008】

RNAiの機能を引き起こすdsRNAは、当初、約30bp以上のdsRNAの細胞内への導入が必要と考えられていたが、最近、更に短い(21~23bp)のdsRNA(短二重鎖RNA: siRNA: small interfering RNA)が、哺乳動物細胞系でも細胞毒性を示さずにRNAiを誘導できることが明らかになった (Nature 411, 494-498, 2001)。siRNAは、体細胞の全ての発生段階において遺伝子の発現を抑制する強力な手段として認識されており、進行性の遺伝病等において、発病する前に、病気の原因となる遺伝子の発現を抑制する方法として期待し得る。しかし、今までこのようなdsRNAによる遺伝子特異的な遺伝子発現の抑制方法をハンチントン病(HD)の遺伝病に効果的に適用した報告はなされていない。

#### 【0009】

#### 【特許文献1】

特開平7-67661号公報。

【特許文献2】

特開2003-503008号公報。

【特許文献3】

WO99/32619。

【特許文献4】

WO01/36641。

【非特許文献1】

J. Med. 315, 1267-1276, 1986。

【非特許文献2】

Neuron 3, 183-190, 1989。

【非特許文献3】

J. Hum. Genet. 49, 7-16, 1991。

【非特許文献4】

Am. J. Hum. Genet. 51, 357-362, 1992。

【非特許文献5】

Annu. Rev. Med. 47, 201-209, 1996。

【非特許文献6】

Nature 391, 806-811, 1998。

【非特許文献7】

Cell 95, 1017-1026, 1998。

【非特許文献8】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692, 1998。

【非特許文献9】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5049-5054, 1999。

【非特許文献10】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964, 1998。

【非特許文献11】

FEBS Lett 479, 79-82, 2000。

**【非特許文献12】**

Nature 411, 494-498, 2001。

**【非特許文献13】**

Cell 72, 6, 971-983, 1993。

**【0010】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、ハンチントン病遺伝子の発現抑制方法、特に、二重鎖RNA(dsRNA)を用いたハンチントン病遺伝子の発現抑制方法、及び、該ハンチントン病遺伝子の発現抑制に用いるハンチントン病遺伝子の発現抑制剤、ハンチントン病予防及び／又は治療薬を提供することにある。

**【0011】****【課題を解決するための手段】**

ハンチントン病は、HD遺伝子転写の第1エクソンにおいてCAGリピートが伸長し、ポリグルタミン(poly Q)トラクトに翻訳され、その結果脳線条体神経細胞が進行的に喪失することによる遺伝性の神経変性疾患である。本発明者は、CAGリピートの上流のHD mRNAを調べたところ、siRNA(短二重鎖RNA)の有効な標的である独特な配列を有する2つの部位を見い出した。そこで、この配列に相同なdsRNA配列として：a) 5'非翻訳領域を標的としたsiRNA-5'UTR、及び、b) CAGリピートの上流近傍領域を標的としたsiRNA-HDエクソン1、更に、c) 現在知られている通常のHD遺伝子と変異HD遺伝子との唯一の相違点はCAGリピートの長さであることから、CAGリピートを直接標的にするsiRNA-CAGを作製し、該siRNAの影響について培養組織モデルを用いることにより、解析したところ、siRNA-HDエクソン1が極めて効果的にHD遺伝子を抑制することを見い出し、本発明を完成するに至った。

**【0012】**

すなわち、本発明はハンチントン病のHD遺伝子のCAGリピートの上流近傍領域にあるmRNAの特異配列を標的として、該配列に相同な二重鎖RNA(dsRNA)を用いて、ハンチントン病遺伝子の発現抑制を行う方法となる。本

発明において、CAGリピートの上流近傍領域のRNA特異配列に相同なdsRNAとしては、bpが約21～23のように短いsiRNA（短二重鎖RNA）を特に効果的に用いることができる。本発明のdsRNAは、ハンチントン病遺伝子の発現抑制剤として、或いはハンチントン病の予防及び／又は治療薬として、哺乳動物の生体或いは生体細胞に、投与或いは導入して、ハンチントン病の予防及び／又は治療を行うことができる。

### 【0013】

すなわち具体的には本発明は、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な二重鎖RNAを用いることを特徴とするハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項1）や、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な二重鎖RNAが、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項1記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項2）や、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列が、ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域であることを特徴とする請求項1又は2記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項3）や、ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に相同な二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び配列表の配列番号4に示される塩基配列からなる二重鎖RNA配列を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項4）や、ハンチントン病遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に相同な短二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び該塩基配列に相補的な配列である配列表の配列番号4に示される塩基配列からなる短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項2又は3記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項5）や、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な短二重鎖RNAが、配列表の配列番号3に示されるRNA配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された塩基配列と該塩基配列に相補的な塩基配列との短二重鎖RNAであることを特徴とする請求項2又は3記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項6）や、二重鎖RNAが、合成により製造されたそれぞれのRNAから形成された二重鎖RNAであることを特徴とする請求

項1～6のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項7）や、二重鎖RNAが、それぞれのRNAを遺伝子組換え方法を用いることにより製造された二重鎖RNAであることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項8）や、遺伝子組換え方法を用いることにより製造された二重鎖RNAが、請求項1～6のいずれか記載のRNAをそれぞれ転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞に導入し、生成されたRNAを取得することによって形成されたものであることを特徴とする請求項8記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項9）からなる。

#### 【0014】

また本発明は、請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを有効成分とするハンチントン病遺伝子の発現抑制剤（請求項10）や、請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを有効成分とするハンチントン病予防及び／又は治療薬（請求項11）や、薬学的に許容される担体とともに、二重鎖RNAを含有することを特徴とする請求項11記載のハンチントン病予防及び／又は治療薬（請求項12）からなる。

#### 【0015】

更に本発明は、請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを、哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することを特徴とするハンチントン病の発症の予防及び／又は治疗方法（請求項13）や、請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入し、発現することを特徴とする哺乳動物の生体或いは生体細胞におけるハンチントン病遺伝子の発現を抑制する方法（請求項14）や、請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子の哺乳動物生体或いは生体細胞への導入を、請求項1～6のいずれか記載のRNAをそれぞれ転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することによって行われることを特徴とする請求項14記載のハンチントン病遺伝子の発現抑制方法（請求項15）からなる。

#### 【0016】

### 【発明の実施の形態】

本発明は、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な二重鎖RNAを用いることにより、ハンチントン病遺伝子の発現を抑制する方法となる。ハンチントン病は、HD遺伝子の転写の第1エクソンにおいてCAGリピートが伸長し、ポリグルタミン(poly Q)トラクトに翻訳され、その結果脳線条体神経細胞が進行的に喪失することにより遺伝性の神経変性疾患であるが、HD遺伝子の通常の配列と変異HD配列については、既に知られている(Annu. Rev. Med. 47, 201-209, 1996)。本発明は、該遺伝子の転写の第1エクソン(NCBIアクセッション番号 L12392及びNM\_002111の1~584番目；配列表の配列番号1、その遺伝子の対応するアミノ酸配列については、配列番号2に示される)(Cell 72, 6, 971-983, 1993)のCAGリピートの上流近傍領域に、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列が存在することを見い出したことに基くものであり、本発明において、ハンチントン病遺伝子の発現を抑制するためのdsRNAの構築は、該mRNAの特異配列に相同なdsRNA配列を含む配列として構築される。

### 【0017】

本発明におけるハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同な二重鎖RNAの好ましい例としては、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的短二重鎖RNA(s i RNA)を挙げることができ、その特に好ましいs i RNAとして、配列表の配列番号3に示される塩基配列と配列表の配列番号4に示される塩基配列からなるdsRNAを例示することができる。また、本発明においては、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に相同的s i RNAとして、配列表の配列番号3に示されるRNA配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された変異塩基配列と該塩基配列に相補的な塩基配列とのs i RNAとして構築することができる。

### 【0018】

本発明の二重鎖RNA(dsRNA)を作製するには、合成による方法及び遺伝子組換えを用いる方法等、公知の適宜の方法を用いることができる。合成による方法では、mRNAの特異配列に基づき、対応するRNA配列或いは該特異配

列に対して、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された変異塩基配列をそれ自体公知の方法で合成することができる。また、遺伝子組換え方法を用いるd s RNAの作製においては、それ自体既に良く知られているように、作製するRNAをそれぞれ転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入し、転写により生成されたRNAを取得することによって作製することができる。該二重鎖RNA（d s RNA）の作製に際して、ハンチントン病遺伝子のmRNAの特異配列に対して、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された変異塩基配列からなるd s RNAを作製するには、それ自体公知の遺伝子工学的手法によって、塩基配列を変換して、行うことができる。

#### 【0019】

本発明の二重鎖RNA（d s RNA）は、ハンチントン病遺伝子の発現抑制剤或いはハンチントン病の予防及び／又は治療薬として、提供することができる。該薬剤を哺乳動物或いは哺乳動物細胞に投与又は導入するに際しては、この分野で通常用いられる薬学的に許容される担体とともに用いることができる。該薬学的に許容される担体とともに用いる薬学的組成物は、その投与形態、例えば経口（口腔内又は舌下を含む）投与、或いは非経口投与（注射剤等）等に合わせて、薬学の分野ではそれ自体周知の製剤形態で製剤化することができる。

#### 【0020】

本発明においては、本発明の二重鎖RNA（d s RNA）の哺乳動物或いは哺乳動物細胞への導入を、本発明のd s RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入し、発現することによって行うことができる。該遺伝子の導入は、それ自体公知の遺伝子導入方法によって行うことができる。例えば、本発明のd s RNAのそれぞれのRNAを転写するDNA配列からなる遺伝子を組み込んだベクターを哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することによって行うことができる。該ベクターとしては、既に公知のプラスミドやウイルスベクターを遺伝子導入用のベクターとして用いることができる。このようなベクターとしては、例えば、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、アデノウイルスベクター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベクター等のウイルスベ

クターを好適に挙げることができる。

### 【0021】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【材料及び方法】

##### (s i R N A s の作製)

ハンチントン病遺伝子のエクソン1領域 (NCBI アクセッション番号 : L 12392 及び NM\_002111 の 1 ~ 584 番目) を基にして、3種類の R N A s を設計した (図 1)。21ヌクレオチドからなる 3種類の R N A s (① s i R N A-H D エクソン1 センス鎖: 配列番号 1 の 343 ~ 363 番目; 配列番号 3、アンチセンス鎖: 配列番号 1 の 341 ~ 361 番目に相補的; 配列番号 4 ② s i R N A-5' UTR センス鎖: 配列番号 1 の 190 ~ 210 番目; 配列番号 5、アンチセンス鎖: 配列番号 1 の 188 ~ 208 番目に相補的; 配列番号 6 ③ s i R N A-CAG センス鎖: 配列番号 1 の 367 ~ 387 番目; 配列番号 7、アンチセンス鎖: 配列番号 1 の 409 ~ 429 番目に相補的; 配列番号 8、すべて図 1 参照) を化学的に合成し、H P L C 精製を行った (Xeragon, USA)。二重鎖 s i R N A s は、アニーリングバッファー (100 mM 酢酸カリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、30 mM H E P E S、0.1 N 水酸化カリウムで pH 7.4 に調整、4 °C で保存) 中で、20 mM のセンス鎖及びアンチセンス鎖 R N A をアニールさせた。反応混合物を 95 °C 5 分で反応させた後、1.5 時間かけて 37 °C まで徐々に冷却し、6 ~ 20 時間室温下において。アニール後の s i R N A s は、使用時まで、-20 °C 若しくは -80 °C で保存した。

### 【0022】

##### (プラスミドの構築)

5' UTR エクソン1 及び H D エクソン1 の 2種類の発現ベクターを構築した。2つのタイプのコンストラクトは、5' UTR を含むもの、又は含まないもの、そして、両タイプとも通常 (34 の CAG リピートを含む) 又は変異 (35

以上のCAGリピートを含む) HD遺伝子を用いて作製した。コンストラクトは、ヒトHD 5'UTR断片及びエクソン1の完全長pd1EGFP-N1 (de-stabled EGFP, Clontech) EGFPを持つインフレームと融合させた(図2参照)。

### 【0023】

(細胞系及び培地)

COS-7細胞 (African green monkey fibroblasts: アフリカミドリザル繊維芽細胞)、SH-sy5y細胞 (human neuroblastoma: ヒト神経芽細胞腫)、及びNeuro-2A細胞 (mouse neuroblastoma: マウスヒト神経芽細胞腫) のそれぞれ異なる起源を持つ3種の細胞系を用いた。COS-7細胞は、Minimum Essential Medium-Alpha Medium (Gibco BRL)、SH-sy5y細胞及びNeuro-2A細胞は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地 (Gibco BRL) 中でそれぞれ培養した。なお、培地中には、10%熱非動化ウシ胎児血清、10U/mLペニシリン(明治製薬社製)、及び50μg/mLストレプトマイシン(明治製薬社製)をそれぞれ含む。

### 【0024】

(トランスフェクション)

トランスフェクション24時間前に播種した培養細胞を、抗生素質を含まない10%FBS含有培地の中で増殖させた。2種類のトランスフェクション試薬を用いることにより、構造プラスミド及びsiRNAsの細胞への導入を行った。

a. Effectene (Qiagen, Germany) : 細胞培養及びトランスフェクション実験には、96穴プレートを用いた。製造者の取扱説明書にしたがって、約40~60%コンフルエントの細胞を、トランスフェクション前に24時間前培養した。0.5μLのEffectene試薬を各穴に添加し、24時間後に結果を解析した。

b. Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) : 製造者の取扱説明書にしたがって、約80%コンフルエントの細胞を、トランスフェクション前に24時間の前培養を行った。0.3μLのLipofectamine 2000試薬を各穴に添加した。

なお、a、bいずれの試薬を用いた実験においても、24~48時間後に発現レベルを解析した。

c. ヒト内因性HD遺伝子発現の抑制に対するsiRNAsの影響を調べるため

に、Lipofectamine 2000試薬を用いて、s i RNAs をSH-sy5y細胞に導入した。トランスフェクション後48時間後に細胞を回収し、全RNAをTrizol (Invitrogen, USA) を用いて抽出した。

#### 【0025】

(s i RNA効果の定量的評価)

トランスフェクション後24時間及び48時間後に培養プレートを蛍光顕微鏡で観察した。s i RNAの効果を定量的に評価するために、Wallac 1420 ARVO s x (ParkinElmer, USA) 又はFluoreScan IIを用いて、GFP蛍光を測定した(励起: 485 nm、発光: 538 nm)。

#### 【0026】

(mRNAレベルの定量)

トランスジェニックHDエクソン1-E GFP mRNAの定量的解析は、LightCycler (Roche, USA) を用いたリアルタイムRT-PCRにより行った。SH-sy5y細胞の内因性HD発現におけるs i RNA-HDエクソン1の効果をLightCycler (Roche, USA) を用いた定量的RT-PCRにより測定した。コントロールとして、各サンプルごとのGAPDH及びβ-アクチンの発現レベルを定量した。

#### 【0027】

[結果]

COS-7培養細胞を用いて、合成s i RNAの抑制効果を、発現コンストラクトと共にコトランスフェクトすることにより解析した。その結果、本発明者のs i RNAは、s i RNAによって効果が異なるものの、外因性HD遺伝子エクソン1の発現を抑制したことを示した(図3~5、参考写真1~3参照)。調べた3種のs i RNAのうち、s i RNA-HDエクソン1は非常に高い効果を示し、培地中のs i RNAの終濃度が40 nMのときに、標的である導入遺伝子の発現を80%以上抑制した。これに対して、他の2種のs i RNA (s i RNA-5'UTR、s i RNA-CAG) は中程度から弱い効果しか示さなかった(図6a、GFP光による測定により判断)。さらに、本発明者は、2種のs i RNAによる抑制効果は遺伝子特異的であるが、s i RNA-CAGは、HD遺伝

子エクソン1がないベクターの発現を抑制する非特異的な抑制効果があることが観察された（図6 b）。予想通り、siRNAは、定量的RT-PCRにより推測された標的であるトランスクレプト遺伝子のmRNA分解を誘導した（データは示されていない）。

### 【0028】

ハンチントン病（HD）は選択的な神経細胞死によって引き起こされるものであり、神経細胞内のHDの発現を抑制することが最も重要である。神経細胞はRNAiに対し最も抵抗力があるとみなされてきたが（Gene 263, 103-112, 2001）、神経細胞内でうまく機能していることが実証された（PNAS 99, 18, 11926-11929, 2002）。本発明者による、siRNAと発現コンストラクトを、SH-sy5y（ヒト神経芽細胞腫）培養細胞内にコトランスクレクトした実験によれば、siRNA-HDエクソン1がCOS-7細胞培養と比較して効果は少ないものの、他の2種のsiRNAは低程度の効果しかないか、もしくは効果がなかった（図6 a）。

### 【0029】

上記の結果により、siRNA-HDエクソン1が、ハンチントン病（HD）の発現を最も抑制することが明らかになったので、本発明者は、SH-sy5y細胞における内因性HDの発現に対する影響を調べた。HD mRNAの定量的測定により、siRNA-HDエクソン1を使用してから48時間後には、内因性HD遺伝子の発現が60%以上阻害されることが示された。ところが、GAPDHとβ-アクチン両方のmRNAレベルはどちらも明らかに変化しなかったので、siRNA-HDエクソン1がHD遺伝子を特異的に抑制することが証明された（図6 c）。

### 【0030】

#### [考察]

理想的なアプローチとしては、毒性が現れる前に、（35以上のCAGリピートを持つ）変異対立遺伝子の発現を抑えることである。しかし、siRNAとそれぞれ異なるCAGリピートの長さ（14～149）を含むコンストラクトとの組合せたところ、抑制効果がCAGリピートの長さとは無関係であることが明

らかになった。

### 【0031】

本研究により、s i RNAの一つが、ハンチントン病（H D）の発現の特異的抑制を効率的に仲介することが明らかになった。RNA i は成熟したマウスにおいても機能することが示されたので（Nature 418, 38-39, 2002）、H D発現の効率的な抑制は、様々の種類の細胞及びモデル動物の生体内における内因性ハンチントンを抑制した後、未だ解明されていないハンチントンの機能（H D遺伝子産物）を研究するのに有用である。s i RNA技術を治療法として利用することはH D患者の治療の戦略となりうる（Mol. Med. Today 3, 175-183, 1997）。特定の範囲でのH D発現の抑制により、疾病の進行を停止させることができる。なぜなら、ハンチントンの機能は、H D患者において発現した遺伝子産物の量に対して敏感に（もしくは、検出限界以下）現れるようには見えないからである（Cell 101, 57-66, 2000）。

### 【0032】

#### 【発明の効果】

本発明においては、ハンチントン病遺伝子発現を特異的かつ効率的に抑制する二重鎖RNA（d s RNA）の作製に成功した。本発明のd s RNAは、ゲノム中の配列の希少性の検索及びハンチントン病遺伝子産物の予測二次構造の検討結果から二重鎖RNA配列を決定し、作製したものであるが、本発明のd s RNAは、RNA干渉により遺伝子発現を抑制するが、その効果が特異的かつ効率的であり、ハンチントン病遺伝子発現を特異的かつ効率的に抑制する。特に、本発明で構築された短二重鎖RNA（s i RNA）は顕著な抑制効果を奏し、ハンチントン病の遺伝子治療実現化のための薬剤としての期待が大きい。

ハンチントン病は進行性で有用な治療法が確立されていない遺伝性疾患である故に、疾患原因である変異遺伝子を特異的かつ効率的に発現抑制すれば有用な治療法となると期待されている。本発明の二重鎖RNA（d s RNA）によるRNA i（RNA干渉）の応用は上記目的を達成するに有望な手段であり、ハンチントン病治療法の開発における本発明の寄与は大きい。

### 【0033】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Knock down Huntington's Disease gene by siRNAs

<130> B05P02

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 584

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (316)..(582)

<400> 1

ttgctgtgtg aggcagaacc tgcgggggca gggcgggct ggttccctgg ccagccattg 60

gcagagtccg caggctaggg ctgtcaatca tgctggccgg cgtggccccc cctccgcccgg 120

cgcggccccc cctccgccc ggacacgtctg ggacgcaagg cgccgtgggg gctgccggga 180

cgggtccaag atggacggcc gtcaggttc tgctttacc tgccggccag agccccattc 240

attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cggcccgagg cctccgggaa ctgccgtgcc 300

gggcgggaga ccgcc atg ggc acc ctg gaa aag ctg atg aag gcc ttc gag 351

Met Ala Thr Leu Glu Lys Leu Met Lys Ala Phe Glu

1

5

10

tcc ctc aag tcc ttc cag 399

Ser Leu Lys Ser Phe Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

15

20

25

cag 447

Gln Pro Pro Pro Pro

30

35

40

ccg ccg ccg ccg cct cct cag ctt cct cag ccg ccg ccg cag gca 495

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala

45

50

55

60

cag ccg ctg ctg cct cag ccg cag ccg ccc ccg ccg ccg ccc ccg 543

Gln Pro Leu Leu Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro

65

70

75

cca ccc ggc ccg gct gtg gct gag gag ccg ctg cac cga cc 584

Pro Pro Gly Pro Ala Val Ala Glu Glu Pro Leu His Arg

80

85

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Thr Leu Glu Lys Leu Met Lys Ala Phe Glu Ser Leu Lys Ser

1

5

10

15

Phe Gln Gln

20

25

30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

35

40

45

Pro Pro Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala Gln Pro Leu Leu

50

55

60

Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro

65

70

75

80

Ala Val Ala Glu Glu Pro Leu His Arg

85

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-HD Exon1

sense RNA

<400> 3

gccuuucgagu cccucaaguc c

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-HD Exon1

antisense RNA

<400> 4

uccggaagcu cagggagauuc a

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-5' UTR  
sense RNA

<400> 5

gauggacggc cgcucagguu u

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-5' UTR  
antisense RNA

<400> 6

uucuaccugc cggcgagucc a

21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-CAG sense  
RNA

<400> 7

gcagcagcag cagcagcagc a

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: siRNA-CAG

antisense RNA

<400> 8

gucgucgucg ucgucgucgu c

21

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

本発明の実施例における、 siRNAs 及び標的部位の配列を示す図である。

#### 【図2】

本発明の実施例における、 siRNA の標的部位と pd1EGFP N1 の発現コンストラクトを示す図である。なお、 a は、 siRNA を用いた標的部位（黒い矢印）を、 b は、 pd1EGFP N1 プラスミドを、 c は、さまざまな数の C A G リピート（ poly Q ）を含む HD エクソン 1 を挿入した pd1EGFP N1 の発現コンストラクトを示す図である。

**【図3】**

本発明の実施例における、 siRNA-HDエクソン1をコトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す図である。

**【図4】**

本発明の実施例における、 siRNA-5'UTRをコトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す図である。

**【図5】**

本発明の実施例における、 siRNA-CAGをコトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す図である。

**【図6】**

本発明の実施例における、 siRNA-CAGをコトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す図である。なお、 aは、未処理のコントロール（4つの独立した実験）をEGFP光の平均値で標準化することにより、 siRNAの効果及びsiRNAの効果が標的位置と細胞種により異なることを示した図を、 bは、親ベクター（HDエクソン1なし）をそれぞれ3種のsiRNAとコトランスフェクトした結果を、 cは、未処理のコントロールに対する、 HD、β-アクチン、 GAPDHのmRNA量の相対的平均を示す図である。

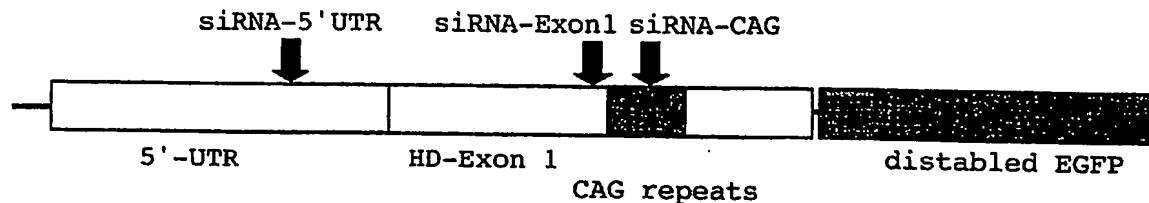
【書類名】

四面

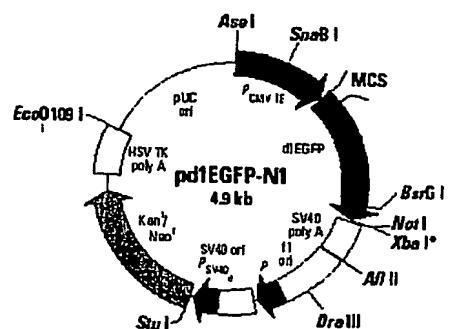
【図 1】

【図2】

## a. Target positions of siRNAs used



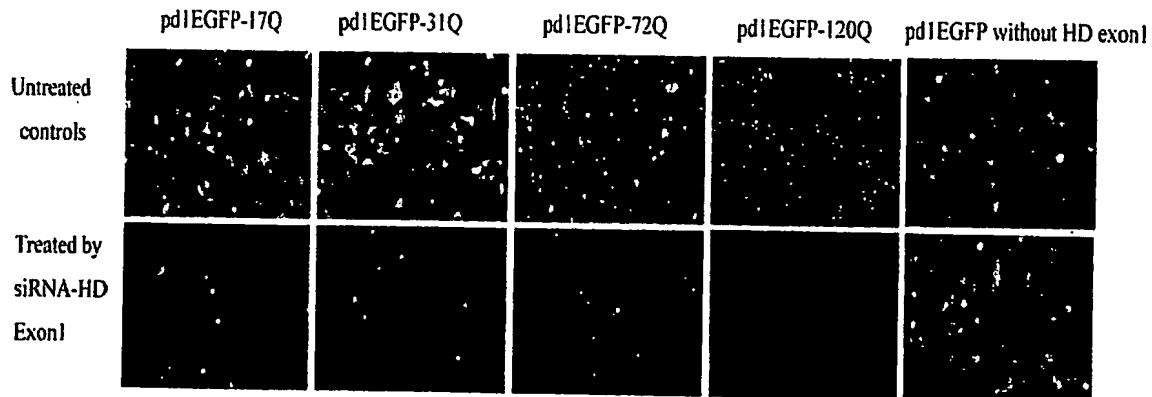
## b. pd1EGFP N1



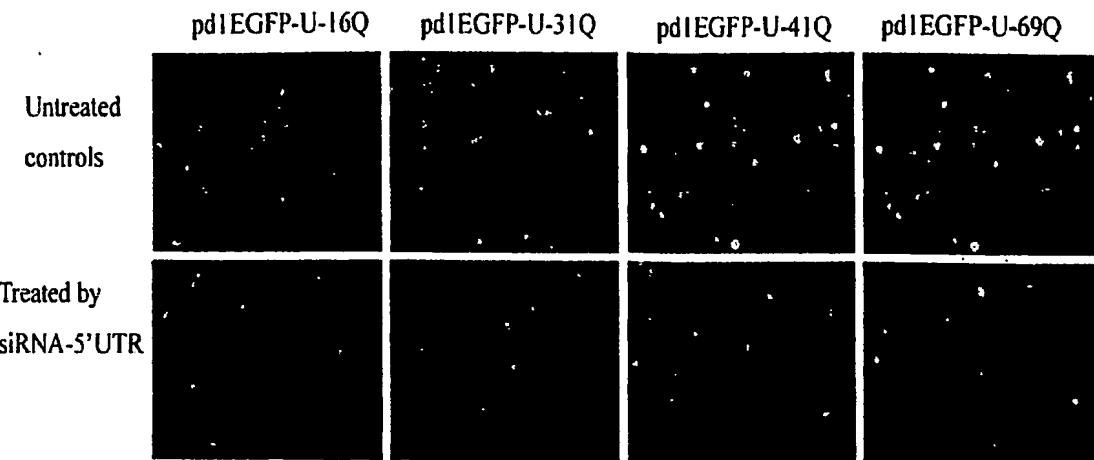
## c. Constructs

	Normal	Mutant
With 5'-UTR	pd1EGFP-U-16Q, pd1EGFP-U-31Q	pd1EGFP-U-41Q, pd1EGFP-U-69Q
Translated region only	pd1EGFP-17Q pd1EGFP-22Q pd1EGFP-31Q	pd1EGFP-49Q pd1EGFP-72Q pd1EGFP-120Q pd1EGFP-151Q

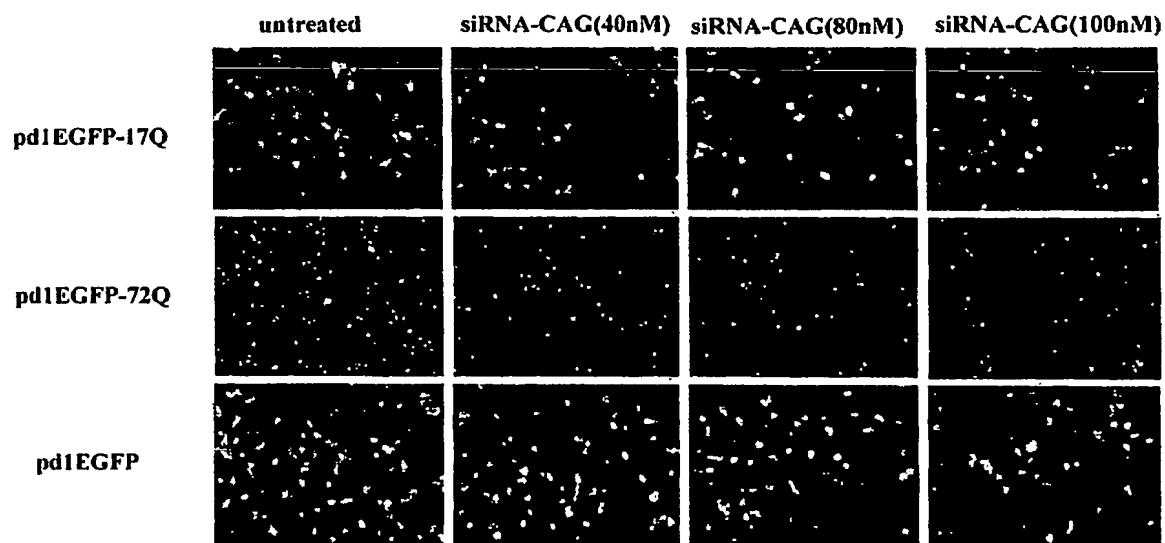
【図3】



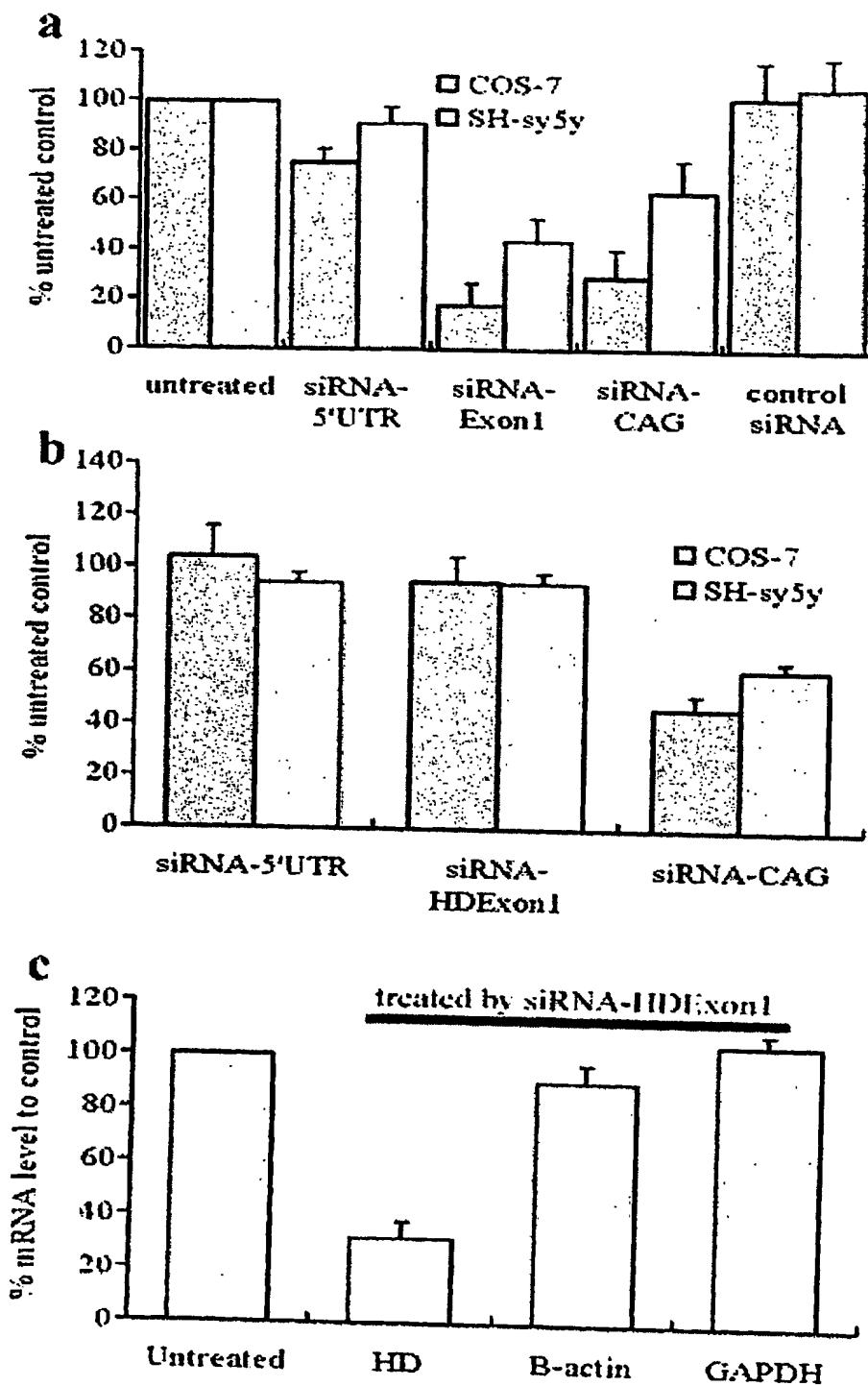
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 二重鎖RNA（dsRNA）を用いたハンチントン病遺伝子の発現抑制方法、及び、該ハンチントン病遺伝子の発現抑制に用いるハンチントン病遺伝子の発現抑制剤、ハンチントン病予防及び／又は治療薬を提供すること。

【解決手段】 ハンチントン病のHD遺伝子のCAGリピートの上流近傍領域にあるmRNAの特異配列を標的として、該配列に相同なdsRNAを用いて、ハンチントン病遺伝子の発現抑制を行う。本発明においては、CAGリピートの上流近傍領域のRNA特異配列に相同なdsRNAとして、bpが約21～23のように短いsiRNA（短二重鎖RNA）を特に効果的に用いることができる。本発明のdsRNAは、ハンチントン病遺伝子の発現抑制剤として、或いはハンチントン病の予防及び／又は治療薬として、哺乳動物の生体或いは生体細胞に、投与或いは導入して、ハンチントン病の予防及び／又は治療を行うことができる。

**【書類名】**

出願人名義変更届（一般承継）

**【提出日】**

平成15年10月31日

**【あて先】**

特許庁長官 殿

**【事件の表示】**

特願2003-136477

**【承継人】****【識別番号】**

503360115

**【住所又は居所】**

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

**【氏名又は名称】**

独立行政法人科学技術振興機構

**【代表者】**

沖村 憲樹

**【連絡先】**

〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

**【提出物件の目録】****【物件名】**

権利の承継を証明する書面 1

**【援用の表示】**

平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

**【物件名】**

登記簿謄本 1

**【援用の表示】**

平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-136477

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏 名 科学技術振興事業団

特願 2003-136477

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADING TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**